

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
25.03.2014
Регистрационный № 021-1213

**АЛГОРИТМ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т.В. Амвросьева, канд. биол. наук Н.В. Поклонская,
З.Ф. Богущ, вед. науч. сотр. К.Л. Дедюля, О.Н. Казинец

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-гигиенистов, врачей-инфекционистов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл.
3. Анализатор иммуноферментный или мультискан.
4. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
5. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
6. Иономер (рН = 121).
7. Источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
8. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия).
9. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
10. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.
11. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
12. Набор для выделения РНК/ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе.
13. Набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции.
14. Набор реагентов для амплификации кДНК ротавирусов.
15. Набор реагентов для амплификации кДНК норовирусов человека 1 и 2 геногрупп.
16. Набор реагентов для амплификации кДНК астровирусов.
17. Набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов.
18. Набор реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов.
19. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free» (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл).
20. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,5; 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNAse free»).
21. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
22. Пипетки стеклянные на 1; 5; 10 мл.
23. Посуда лабораторная (колбы, пробирки).
24. Препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги).
25. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
26. Система для автоматической промывки планшетов.

27. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
28. Тест-система для выявления антигенов ротавирусов человека методом ИФА.
29. Тест-система для выявления антигенов норовирусов человека 1 и 2 геногрупп методом ИФА.
30. Тест-система для выявления антигенов астровирусов человека методом ИФА.
31. Тест-система для выявления антигенов аденовирусов 40 и 41 типов методом ИФА.
32. Тест-система для выявления антигенов энтеровирусов методом ИФА.
33. Набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства (ТУ РБ 100558032.048-2001, изм. 2).
34. Набор для изоляции вирусов из питьевой воды (ТУ ВУ 100558032.227-2013).
35. Термостат, регулируемый до $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
36. Термоциклер.
37. Твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»).
38. Трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
39. Хлороформ (х.ч.) (ТУ 2631-02-11291058-96).
40. Центрифуга рефрижераторная на 1–5 тыс. об./мин.
41. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф»).
42. Центрифуга-вортекс.
43. Холодильник-морозильник (-18 — -20 ; $+4$ — $+8^\circ\text{C}$).
44. Этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

ОБЪЕКТЫ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ (ПВ)

Санитарно-вирусологический контроль ПВ в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения включает отбор и исследование проб, отобранных:

- *из водоисточников* (поверхностных и подземных) перед подачей воды в распределительную сеть на уровне водопроводной станции II подъема (на одиночных подземных водозаборах/скважинах плановый отбор проб не обязателен);
- *распределительной сети* в местах водоразбора в конечных точках зоны влияния водозаборов из открытых водоисточников и подземных групповых (питающихся группой скважин) водозаборов.

ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ПВ

В качестве санитарно-показательных (индикаторных) агентов при оценке ПВ по вирусологическим показателям используются энтеровирусы. Санитарно-вирусологический контроль ПВ предусматривает следующие исследования, периодичность и порядок проведения которых регламентируются приложением к настоящей инструкции:

- обнаружение антигенов (АГ) энтеровирусов;
- обнаружение АГ потенциальных вирусов-контаминантов ПВ (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.);
- обнаружение энтеровирусной РНК;
- выявления инфекционных энтеровирусов (вирусов полиомиелита, серогрупп ЕСНО, Коксаки А и В);
- обнаружение генетического материала (РНК, ДНК) других возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи: норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.

При плановом (текущем) и производственном санитарно-вирусологическом контроле ПВ рутинно контролируемые показатели являются АГ энтеровирусов и/или РНК энтеровирусов. При обнаружении в пробе АГ и/или РНК энтеровирусов проводится их определение в повторно взятой в экстренном порядке (в течение суток) пробе. При обнаружении хотя бы одного из данных показателей в повторно взятой пробе проводятся дальнейшие исследования по выявлению инфекционных энтеровирусов путем выделения их в культурах чувствительных клеток или методом интегрированной с культурой клеток полимеразной цепной реакции (ИКК-ПЦР), а также организуются и осуществляются дополнительные санитарно-вирусологические исследования с целью установления источника и причины вирусной контаминации ПВ в соответствии с алгоритмом, изложенным в настоящей инструкции.

В условиях осуществления внепланового санитарно-вирусологического контроля, кроме исследований по выявлению индикаторных энтеровирусов, при необходимости проводится детекция более широкого спектра потенциальных вирусов-контаминантов ПВ (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.) или конкретного установленного возбудителя регистрируемой инфекции с использованием методов ПЦР и/или ИФА.

АЛГОРИТМ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПВ В СИСТЕМЕ ЦЕНТРАЛИЗОВАННОГО ХОЗЯЙСТВЕННО-ПИТЬЕВОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ

Порядок и методы проведения санитарно-вирусологических исследований ПВ схематично изображены на рисунке.

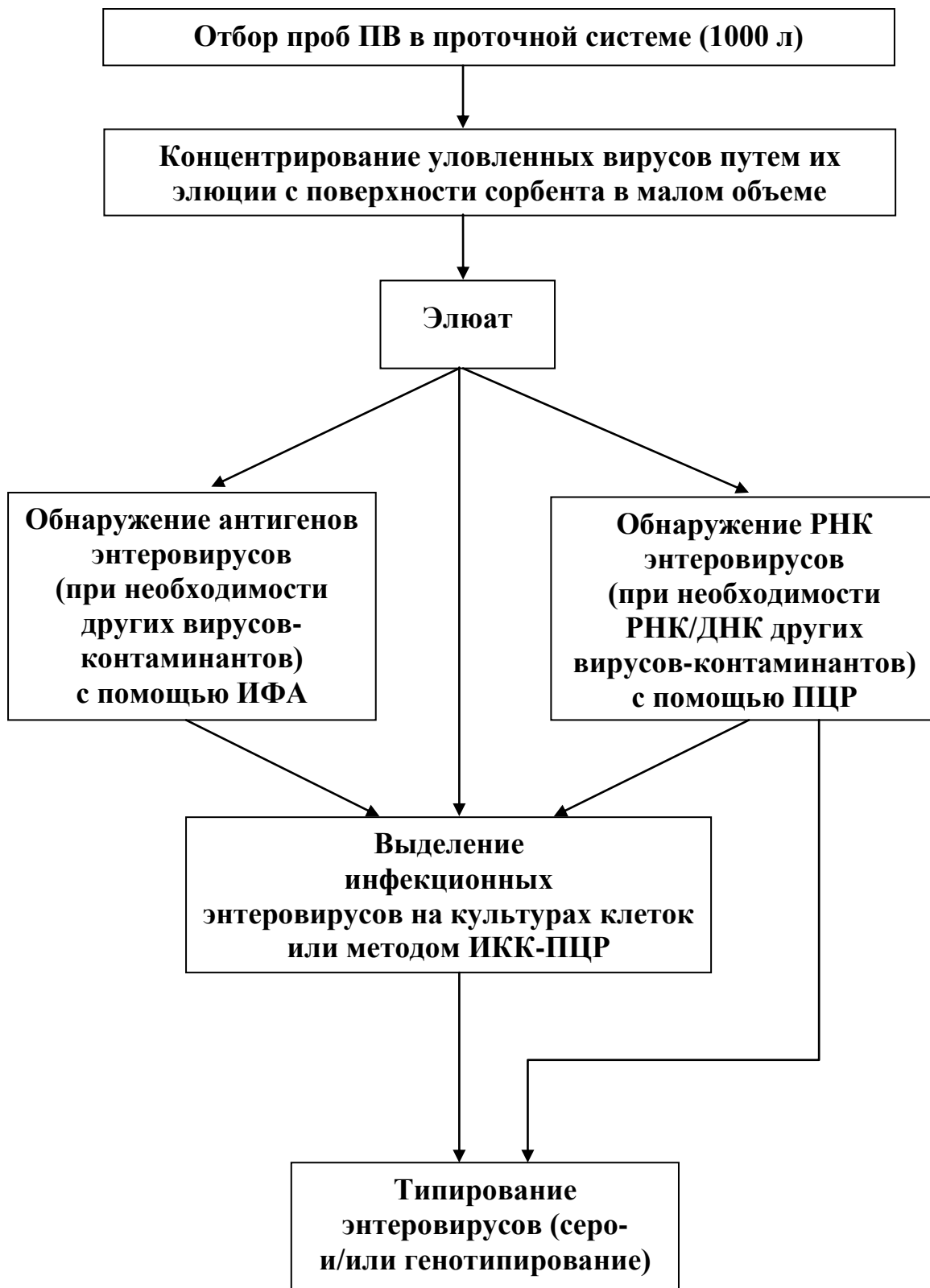


Рисунок — Схема индикации вирусов-контаминантов ПВ

ОТБОР И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРОБ

Отбор проб осуществляется в спецодежде (халате и резиновых перчатках). После окончания работы перчатки обрабатываются спиртом, а халаты стерилизуются. Пробы маркируются с указанием населенного пункта, точки отбора, даты (число, месяц, год), должности и Ф.И.О. производившего отбор. Материал доставляет в лабораторию в максимально короткий срок (не более 6 ч). Доставленный материал немедленно обрабатывается. В порядке исключения

допускается его хранение при температуре $+4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ одни сутки. Каждой пробе присваивается идентификационный номер, под которым она регистрируется в лабораторном журнале. Далее этим номером маркируют все емкости (пробирки, флаконы с культурой клеток и пр.), используемые для исследования и хранения данной пробы в данной лаборатории.

Отбор проб проводится проточным методом, основанным на пропускании через вирус-улавливающий сорбирующий фильтр струи ПВ в объеме 1000 л. Для этого используются специальные средства в виде «Набора для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства» (ТУ РБ 100558032.048-2001, изм. 2) или «Набора для изоляции вирусов из питьевой воды» (ТУ ВУ 100558032.227-2014) в строгом соответствии с прилагаемой к ним инструкцией. Дальнейшая элюция сорбированного вирусного материала и его концентрирование осуществляются с использованием того же набора, которым пользовались при отборе пробы в строгом соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.

Сортировка проб

После пробоподготовки каждый образец ПВ делится на 4 аликвоты, одна из которых используется для выделения ЭВ на культурах клеток, вторая — для ПЦР-исследований, третья — для ИФА-исследований, четвертая — хранится при -20°C (как исходный материал)

Обнаружение антигенов вирусов с помощью ИФА

Для ИФА-исследований по выявлению антигенов энтеровирусов и при необходимости антигенов других вирусов-контаминантов ПВ необходимо дополнительное концентрирование проб с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ), которое проводится в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005). ИФА-исследования осуществляются с использованием соответствующих тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке, в соответствии с инструкцией производителя.

Обнаружение РНК энтеровирусов с помощью ПЦР

Обнаружение РНК энтеровирусов осуществляется при помощи ПЦР-тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке. Исследования осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.

Обнаружение РНК/ДНК других возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи с помощью ПЦР

Обнаружение РНК/ДНК других возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.) проводится при помощи ПЦР-тест-систем различных производителей, предназначенных для санитарно-вирусологических исследований и зарегистрированных в установленном порядке. Исследования осуществляются в соответствии с инструкцией производителя.

Выделение энтеровирусов в культурах клеток и их серотипирование

Выделение энтеровирусов, определение их инфекционного титра и серотипа (серотипирование) осуществляются стандартными методами в соответствии с «Инструкцией по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций» (рег. № 133-

1204 от 12.04.2005).

Обнаружение РНК инфекционных энтеровирусов с помощью ИКК-ПЦР

Исследования проводятся в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005).

Молекулярное типирование энтеровирусов (вирусов-контаминантов) ПВ

Молекулярное типирование проводится при необходимости осуществления оперативной идентификации (установления серо-, генотипа) энтеровирусного агента, обнаруженного в ПВ с помощью ОТ-ПЦР, или в случае невозможности его выделения и серотипирования в культуре клеток с помощью реакции нейтрализации. В связи с тем, что данные высокотехнологичные исследования требуют специального оборудования, материалов и обученных специалистов, как правило, они проводятся на базе специализированных для этих работ лабораторий РНПЦ ЭМ в рамках молекулярно-эпидемиологических исследований в соответствии с инструкцией по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции» (рег. № 165-1208 от 11.06.2009).

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПВ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка эпидемической безопасности питьевой воды осуществляется исходя из показателей и их нормативов, изложенных в таблице.

Таблица 1 — Критерии оценки эпидемиологической безопасности ПВ

Показатели	Нормативы
АГ энтеровирусов	Отсутствие в 1000 л воды
АГ возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.)	Отсутствие в 1000 л воды
РНК энтеровирусов	Отсутствие в 1000 л воды
РНК (ДНК) возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.)	Отсутствие в 1000 л воды
Энтеровирусы в инфекционной форме	Отсутствие в 1000 л воды

При осуществлении *планового (текущего) санитарно-вирусологического контроля и производственного контроля* исследуемая ПВ признается эпидемически безопасной в отношении вирусных инфекций человека при отсутствии инфекционных энтеровирусов в 1000 л ПВ и отсутствии их АГ и РНК в повторно взятой в экстренном порядке (в течение суток) пробе объемом 1000 л.

В условиях проведения *внепланового санитарно-вирусологического контроля* исследуемая ПВ признается эпидемически безопасной в отношении вирусных инфекций человека при отрицательных значениях всех регламентируемых показателей в объеме 1000 л, включая антигены и генетические маркеры (РНК, ДНК) детектируемых вирусных агентов.

АЛГОРИТМ УСТАНОВЛЕНИЯ ВОДНОГО ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Для получения лабораторных доказательств в пользу водного пути передачи вирусной инфекции необходимо проведение комплекса санитарно-вирусологических, клинико-диагностических и молекулярно-эпидемиологических исследований с целью:

- установить этиологию данной инфекции, что предполагает серо- и генотипическую идентификацию ее возбудителя;
- установить факт контаминации ПВ данным возбудителем;
- установить генетическую идентичность этиологического агента вирусной инфекции — вируса, выделенного из клинического материала пациента, и вируса-контаминанта ПВ — вируса, обнаруженного в пробе ПВ.

Данные исследования осуществляются в соответствии с инструкцией по применению «Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи» (рег. № 002-0213 от 13.06.2013).

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ ОСУЩЕСТВЛЕНИИ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПВ В СИСТЕМЕ ЦЕНТРАЛИЗОВАННОГО ХОЗЯЙСТВЕННО-ПИТЬЕВОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные проблемы при детекции РНК энтеровирусов с помощью ПЦР и ИКК-ПЦР

Наличие ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов (в соответствии с критериями, изложенными в инструкции на соответствующую тест-систему) свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Пути устранения ложноотрицательных результатов:

- на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;
- для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпирикарбонатом вода или соответствующий РНК-элюент, входящий в состав набора, во избежание загрязнения препарата РНКазами.

Пути устранения ложноположительных результатов:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон, использование отдельных наборов посуды, пипеток и отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон;
- строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.

Возможные проблемы при осуществлении ИФА

1. Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контроля не соответствуют установленным пороговым уровням.

Пути устранения:

- строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

2. Соотношение показателей оптической плотности отрицательного и

положительного контроле ниже 2,1.

Пути устранения:

- строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

Возможные проблемы при выделении энтеровирусов в культурах клеток и их серотипировании

Невозможность выделить энтеровирусный цитопатический агент классическим культуральным методом и/или невозможность его серотипировать с помощью реакции нейтрализации в культуре клеток.

Пути устранения:

- выявление в исследуемой пробе энтеровирусной РНК методом ОТ-ПЦР;
- проведение молекулярного типирования энтеровирусного материала в положительных пробах.

Возможные проблемы при получении доказательств водного пути передачи вирусных инфекций с использованием биоинформационных методов анализа

Низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования.

Пути устранения:

- проведение 3 пассажей исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вируса, если он является культивируемым (адено-, энтеровирусы).

Если вирусы-контаминанты ПВ являются некультивируемыми или плохо культивируемыми (рота-, норо-, астровирусы), то их низкое содержание в пробах считается непреодолимым препятствием для секвенирования. В последнем случае лабораторно подтвержденное наличие вирусной контаминации ПВ в совокупности с данными эпидемиологического расследования могут рассматриваться в качестве достаточных доказательств для установления водного пути передачи вирусной инфекции.

Приложение

Периодичность отбора проб и контролируемые вирусологические показатели при осуществлении санитарно-вирусологического контроля ПВ в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения

Виды контроля	Водоисточники ¹⁾ , вирусологические показатели				Распределительная сеть ²⁾ , вирусологические показатели	
	подземные		поверхностные			
	антиген (РНК) энтеровирусов ³⁾	энтеровирусы ⁴⁾	антиген (РНК) энтеровирусов ³⁾	энтеровирусы ⁴⁾	АГ (РНК) энтеровирусов ³⁾	энтеровирусы ⁴⁾
Плановый (текущий)	4 раза/год (1 раз в сезон)	при наличии антигена (РНК)	1 раз/мес. (ежемесячно)	при наличии антигена (РНК)	1 раз/мес. (ежемесячно)	при наличии антигена (РНК)
Внеплановый ⁵⁾	в соответствии с разработанной рабочей программой	при наличии антигена (РНК)	в соответствии с разработанной рабочей программой	при наличии антигена (РНК)	в соответствии с разработанной рабочей программой	при наличии антигена (РНК)
Производственный	в соответствии с разработанной рабочей программой	при наличии антигена (РНК)	в соответствии с разработанной рабочей программой	при наличии антигена (РНК)	в соответствии с разработанной рабочей программой	при наличии антигена (РНК)

Примечания:

1 — ¹⁾ — определение проводится перед подачей воды в распределительную сеть в пробах, отобранных на водопроводной станции II подъема. На одиночных подземных водозаборах (скважинах) плановый отбор проб не обязателен.

2 — ²⁾ — определение проводится в пробах, отобранных в местах водоразбора в конечных точках зоны влияния водозаборов из открытых водоисточников и подземных групповых (питающихся группой скважин) водозаборов. Количество исследуемых проб — не менее 1 на каждый из указанных водозаборов.

3 — ³⁾ — при обнаружении в пробе питьевой воды АГ и/или РНК энтеровирусов проводится их повторное определение в экстренном порядке (в течение суток). При обнаружении в повторно взятой пробе воды проводятся исследования по выявлению инфекционных энтеровирусов методом ИКК-ПЦР или путем выделения на культурах чувствительных клеток.

4 — ⁴⁾ — исследования проводятся путем выделения вирусов в культурах чувствительных клеток или методом ИКК-ПЦР.

5 — ⁵⁾ — в определенных условиях (данные о групповой заболеваемости вирусными инфекциями с водным путем передачи, сведения о заносе на данную территорию новых высокопатогенных вирусов и т. д.), кроме исследований по выявлению индикаторных энтеровирусов, проводится детекция более широкого спектра потенциальных вирусоконтаминантов ПВ (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.) или конкретного установленного возбудителя регистрируемой инфекции с использованием методов ПЦР и/или ИФА.